Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 4, Winter 2023, p. 829-842

Effect of Sucrose on Direct Somatic Embryogenesis of Octoploid Asparagus

Z. Toosi[1], S.J. Mousavizadeh [2*], K. Mashayekhi[3], M. Alizadeh[4]

Received: 08-06-2021 Revised: 13-10-2021 Accepted: 24-10-2021 Available Online: 30-01-2023	**How to cite this article:** Toosi, Z., Mousavizadeh, S.J., & Mashayekhi, K. (2023). Effect of Sucrose on Direct Somatic Embryogenesis of Octoploid Asparagus. *Journal of Horticultural Science 36*(4): 829-842. (In Persian with English abstract) **DOI**: 10.22067/jhs.2021.70871.1061

Introduction

Asparagus, scientifically named *Asparagus officinalis.* L is a perennial plant belonging to the *Asparagaceae* family. Asparagus is a large genus in this genus that has about 200 species. The most important species for agricultural purposes is *A. officinalis*. Somatic embryogenesis is the formation of an embryo from an–asexual cell *in vitro* that similar to a seed embryo, is able to develop into a complete seedling. Somatic embryogenesis is a complex molecular and biochemical process based on cellular potentiogenicity and a model in the study of plant growth. In this unique process of embryogenesis, the growth cells acquire the capacity for embryogenesis under conditions of cellular stress. Sucrose is the predominant sugar in plants for energy production and facilitates vital functions. Sucrose is converted to glucose and glucose. Sucrose is the most common source of carbohydrates used in plant tissue culture.

Materials and Methods

The present study was performed in the tissue culture laboratory of the horticulture department of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources in 1399 and 1400. Native Iranian asparagus seeds with octaploid ploidy level were used in this experiment. B_5 medium containing 2, 4-D with a concentration of 2 mg /l was used to induce the embryo. Concentrations of 3, 6, 9, 12 and 15% in liquid medium were used to evaluate the effect of sucrose. The pH of the culture media were adjusted to 5.7. After the induction phase, the samples entered the realization phase and the subculture were cultured in the previous environments but with the aim of emerging the embryos (realization phase) while the hormone was removed from them. After 4 weeks in the embryonic development stage, the number of globular and bipolar embryos was observed using a computer-connected stereoscope at 20 and 40 micron magnifications.

Results and Discussion

The results obtained from this study showed that there is a significant difference between different concentrations of sucrose in terms of embryogenesis formation at different stages of embryogenesis. According to the presented results, change in sucrose concentration caused a change in the formation of embryos and the highest number of spherical embryos was observed with a significant difference ($p < 0.001$) in 9% sucrose concentration. According to the comparison results, the concentration of 9% sucrose showed the highest amount of bipolar embryo among other different concentrations. Statistical results of photosynthetic pigments and anthocyanins showed that there was a significant difference between different concentrations of sucrose. As shown in Figures 2 and 3, the highest levels of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids were observed at a concentration of 9% sucrose and the lowest amount of chlorophyll *a* at concentration of 12% and total chlorophyll and carotenoids at concentration of 3%. Also, the results obtained from regression analysis showed that the highest amount of photosynthetic pigments and starch was observed in 9% sucrose concentration. Finally, in this study, it was found that the best concentration affecting the vegetative embryogenesis of octaploid asparagus is 9% sucrose.

1, 2, 3 and 4- M.Sc. Student and Associate Professors, Department of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mousavizadeh@gau.ac.ir)

Conclusion

Carbohydrates are the main constituents of the plant and are most used in tissue culture medium, especially sucrose for growth and differentiation. It is noteworthy that high concentrations of sucrose are not only nutritional but also change the osmotic pressure in the culture medium. The relationship between glucose status and embryonic formation has been proven. In the meantime, the capacity of sucrose to support embryonic growth is greater, so that increasing sugars such as sucrose increase the potential for embryogenesis. According to the results of the present study, 9% sucrose in B5 culture medium showed an important role in chlorophyll production and caused photosynthesis and carbohydrate metabolism in this medium to increase, and as a result, the amount of sugar and its accumulation in culture explants. Increased in this medium and eventually caused the emergence of embryos with photosynthetic pigments in the resulting seedlings. Increasing the level of sucrose also prevents rapid germination and helps the development of the root system.

Keywords: 2,4-D, Carbohydrate, Embryogenesis, Photosynthetic pigments

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱، ص. ۸۴۲-۸۲۹

اثر ساکارز بر جنین‌زایی رویشی مستقیم مارچوبه اکتاپلوئید

زینب طوسی[۱]- سید جواد موسوی زاده[۲]*- کامبیز مشایخی[۳]- مهدی علیزاده[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲

چکیده

جنین‌زایی رویشی، روش جدیدی برای ازدیاد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای است. کارآیی روش جنین‌زایی رویشی به‌شدت بـه ترکیبـات محـیط کشت بستگی دارد. مانند ساکارز که متداول‌ترین منبع کربوهیدرات است که درکشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. ساکارز محصول نهایی فتوسنتز و قند اولیه منتقل‌شده در آوند آبکش اکثر گیاهان است. به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سـاکارز بـر جـنین‌زایـی رویشـی مارچوبـه (*Asparagus officinalis* L.) اکتاپلوئید، آزمایشی با پنج تیمار ساکارز (۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درصد) انجام پذیرفت. برای انجام ایـن آزمـایش ریزنمونـه‌هـای مارچوبـه حاوی یک جوانه در محیط B_5 در فاز القایی جنین رویشی دارای هورمون 2, 4-D کشت شدند و بعد از دو هفته به فاز ظهور جنین منتقل گردیدنـد. در ادامه بعد از چهار هفته در مرحله ظهور جنین‌ها، تعداد جنین‌های رویشی تولیدشده در مراحل کروی شکل و قطبی در دو بزرگنمـایی ۲۰ و ۴۰ میکـرون، شمارش و عکس‌برداری شد و میزان تأثیر غلظت‌های ساکارز بر میزان رنگیـزه‌هـای فتوسـنتزی و خصوصـیات فیتوشـیمیایی انـدازه‌گیـری شـد. نتـایج به‌دست‌آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ساکارز از لحاظ تشکیل جنین‌های رویشی گیاه مارچوبه وجود دارد. در غلظـت ۹ و ۱۵ درصد ساکارز به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد جنین کروی و قلبی تشکیل شد. همچنین نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل رگرسـیون بیـانگر آن بود که در غلظت ۹ درصد ساکارز بیش‌ترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و نشاسته مشاهده شد. درنهایت در این پژوهش مشخص شد کـه بهتـرین غلظت مؤثر بر جنین‌زایی رویشی مارچوبه اکتاپلوئید، غلظت ۹ درصد ساکارز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : توفوردی، جنین‌زایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات

مقدمه

مارچوبه با نام علمی *Asparagus officinalis* L. گیاه چندساله متعلق به خانواده Asparagaceae می‌باشد. *Asparagus* یک جنس بزرگ در این تیره است که حدود ۲۰۰ گونه دارد (Mukhopadhyay and Desjardins, 1994). مهم‌ترین گونه برای اهداف کشاورزی، *A. officinalis* می‌باشد. مارچوبه یکی از ۲۰ محصول زراعی برتر جهان است. قسمت ساقه خوراکی مارچوبه که به اسپیر مرسوم است به رنگ سبز و سفید تولید می‌شود. *A. officinalis* یک‌گونه دوپایه است که در آن جنسیت توسط ژن غالب M تعیین می‌شود. مارچوبه دیپلوئید (۲n=۲x=۲۰) است. ژنوتیپ‌های ماده هموزیگوس مغلوب (mm) و نرها هتروزیگوت (Mm) هستند (Bhattacharjce and Singhal, 2011). گونه *A. officinalis* در بین مارچوبه‌های خودروی ایران از لحاظ سطح پلوئیدی منحصربه‌فرد بوده و اکتاپلوئید (۲n=۸x=۸۰) می‌باشد. به دلیل داشتن مقاومت به خشکی، دارا بودن سطح پلوئیدی ویژه و همچنین به دلیل تولید بذر کم، محافظت و نگهداری از آن به‌عنوان یک ژرم پلاسم مهم مارچوبه حائز اهمیت می‌باشد (Mousavizadeh *et al.*, 2016). بنابراین به‌کارگیری روش‌هایی مانند جنین‌زایی رویشی، برای ازدیاد این گیاه ضروری می‌باشد. جنین‌زایی رویشی، عبارت است از تشکیل جنین از سلول غیرجنسی در شرایط آزمایشگاهی که مشابه با جنین بذری قادر به نمو بوده و به‌صورت گیاهچه کامل نمو پیدا می‌کند (Mousavizadeh *et al.*, 2010).

جنین‌زایی رویشی یک فرآیند پیچیده مولکولی و بیوشیمیایی است که

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(*- نویسنده مسئول: (Email: mousavizadeh@gau.ac.ir

DOI: 10.22067/jhs.2021.70871.1061

بر اساس ویژگی توتی پوتنسی[1] سلولی و یک مدل در مطالعه رشد گیاه محسوب می‌شود. در این فرآیند منحصربه‌فرد تشکیل جنین، سلول‌های رویشی تحت شرایط استرس سلولی صلاحیت جنین‌زایی را کسب می‌کنند. استرس گیاه که ناشی از تنظیم‌کننده‌های رشد، عناصر مغذی و یا سایر عناصر سیگنالینگ است که باعث برنامه‌ریزی سلولی شده و سلول‌های رویشی را از طریق فعال سازی یا غیرفعال سازی ژن‌ها و شبکه‌های رونویسی به جنین تبدیل می‌کند (Mashayekhi, 2007). کاربرد جنین‌زایی رویشی در گیاهان چوبی شامل افزایش سریع اندازه جمعیت، تکثیر انبوه کلونی و تولید گیاهان عاری از بیماری می‌باشد (Widal *et al*., 2010). مطالعه‌ای توسط موسوی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی جنین‌زایی رویشی مارچوبه بر جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم گونه نادر مارچوبه اکتاپلوئید *A. breslerianus* در محیط کشت جامد B_5 در غلظت‌های بالای 4- ,2 D انجام گرفته است (Mousavizadeh *et al*., 2017). تولید نر برتر مارچوبه از طریق کشت بساک و شناسایی آن با SSR-ESTs از ژنوتیپ‌های سوپر نر از مارچوبه نر رقم Morado de Huetor به‌منظور توسعه پایه های نر و حفظ صفات مانند طعم، بو و مزه از این رقم محلی انجام شده است (Regalado *et al*., 2015). آزمایشی به‌منظور بررسی اثر سطوح پلوئیدی بر فراوانی چند جنینی در ارقام مختلف مارچوبه انجام شد. نتایج تولید جنین‌زایی با سطوح پلوئیدی مختلف را در ارقام مارچوبه نشان داد. نتایج نشان داد که فراوانی چند جنینی به نوع رقم مارچوبه و بسته به ماهیت و سطح پلوئیدی وابسته است (Maciej *et al*., 2012). کارآیی روش جنین‌زایی رویشی به‌شدت به ترکیبات محیط کشت بستگی دارد. مانند ساکارز که متداول‌ترین منبع کربوهیدرات است که در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود و در آوند آبکش گیاهان وجود آن گزارش شده است و به‌عنوان منبع کربن برای رشد در شرایط درون شیشه‌ای انواع مختلف ریز نمونه استفاده شده است (Mashayekhi, 2007). گزارش شده است که قندها بر تشکیل جنین‌های رویشی در محیط کشت تأثیر می‌گذارند (Dogan, 2020). ساکارز به‌عنوان قند غالب در گیاهان برای تولید انرژی است و انجام اعمال حیاتی را تسهیل می‌کنند. ساکارز به گلوکز تبدیل می‌شوند و گلوکز در متابولیسم هوازی و بی‌هوازی مصرف می‌شود. ساکارز متداول‌ترین منبع کربوهیدرات است که در کشت بافت گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. غلظت مختلف قندها بر تشکیل سلول‌های سوماتیک در محیط کشت تأثیر می‌گذارد (Kamada *et al*., 1996). ازآنجاکه ساکارز یکی از مهم‌ترین ترکیبات در جنین‌زایی رویشی است و به‌عنوان منبع کربن، انرژی و عوامل اسمزی در گیاهان شناخته می‌شوند در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز بر جنین‌زایی رویشی مارچوبه بررسی شده است. محتوای قند محلول، نشاسته و پروتئین در مراحل مختلف جنین‌زایی به‌طور قابل‌توجهی متفاوت است. محتویات قند و نشاسته محلول به‌تدریج توسعه جنین رویشی کاهش و محتوای پروتئین محلول افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد مواد کربوهیدرات توسط رشد و نمو جنین رویشی مصرف می‌شود درحالی‌که افزایش محتوای پروتئین شرایط مواد را برای بلوغ و جوانه زدن جنین‌های سوماتیک فراهم می‌کند (Bartos *et al*., 2018). در بررسی کشت سوسپانسیون سلولی هویج که حاوی اکسین بود، مشاهده شد که بدون کاربرد اینورتاز خارجی، با اضافه کردن ساکارز به محیط در مدت ۲۴ ساعت، ساکارز کاملاً هیدرولیز شده و به صورت گلوکز جذب سلول‌ها شده سپس در طی ۷ روز اول کشت، فروکتوز باقی مانده نیز جذب می‌گردد و درست در همین زمان کشت‌ها بیشترین پتانسیل را در جنین‌زایی نشان دادند. این مطلب وجود یک همبستگی مثبت بین میزان ساکارز موجود درون سلولها و همچنین تعداد توده‌های سلولی پیش‌جنینی بوجود آمده را نشان می‌دهد (Mashayekhi, 2007). هنگامی‌که محیط کشت با غلظت بالای قند همراه باشد منجر به فنولیک و افزایش نکروز بافت می‌شود که به طور قابل‌توجهی رشد و تکثیر بافت‌ها را کاهش می‌دهد. تعداد کشت‌هایی که جنین‌زایی رویشی را نشان می‌دهند نیز به نوع کربوهیدرات‌های مورد استفاده بستگی دارد. گزارش شده است که بین کربوهیدرات‌ها، گلوکز و ساکارز سبب جنین‌زایی با فرکانس بالا می‌شوند. وقتی غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط پایه MS مورد استفاده قرار گرفت، بیشترین میانگین تعداد جنین رویشی با ۳٪ و به دنبال آن ۶٪، ۱٪، ۹٪ و ۱۲٪ به دست آمد (Eapen and George, 1990). بنابراین، هدف کلی از پژوهش حاضر، به دست آوردن غلظت‌های مناسب ساکارز بر جنین‌زایی رویشی مارچوبه اکتاپلوئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مکان و مواد گیاهی

پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ اجرا شده است. از بذور مارچوبه بومی ایران با سطح پلوئیدی اکتاپلوئید (Mousavizadeh *et al*., 2017) در این آزمایش استفاده گردید.

تهیه محیط کشت و القای جنین: ابتدا بذور با آب معمولی شسته و سپس به مدت ۳۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد شستشو گردید.

1- Totipotency

ضدعفونی بذور با هیپوکلرید سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس بذور سه بار با آب مقطر استریل شستشو شده و روی محیط‌های کشت جهت جوانه‌زنی و رشد استقرار یافتند. از محیط کشت پایه B5 (Gamburg *et al.*, 1968) حاوی تنظیم کننده رشد 2-4, D با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر جهت القای جنین رویشی استفاده گردید. به‌منظور بررسی اثر ساکارز از غلظت‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درصد در محیط مایع استفاده شد. pH محیط‌های کشت با استفاده از دستگاه pH متر[1] و با کاربرد سود یا اسید کلریدریک در محدوده ۵/۷ تنظیم شد. پس از آماده کردن محیط‌های کشت و اعمال تیمارها، محلول‌ها در ظروف T شکل توزیع و در هر ظرف، ۲۵ میلی‌لیتر از محلول محیط کشت توزین گردید. آنگاه درب ظروف با سه لایه فویل بسته و با اتوکلاو[2] در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۳ اتمسفر استریل شدند (Mousavizadeh *et al.*, 2010). برای القای جنین‌زایی مستقیم از ریز نمونه‌های تک گره (حاوی یک جوانه) گیاهچه‌های رشد کرده درون شیشه استفاده شد (Mousavizadeh *et al.*, 2017). برای تهیه ریز نمونه‌های تک گره، اندام هوایی گیاهچه به قطعاتی با طول یک سانتیمتر حاوی یک گره تقسیم‌شده و به ظروف T شکل حاوی ۲ پی‌پی‌ام تنظیم کننده رشد 2,4-D به همراه محیط کشت مایع فاز القا، منتقل شدند. در هر ظرف سه ریز نمونه قرار داده و سپس درب ظروف توسط فویل استریل پوشانده و با پارافیلم کاملاً درزگیری شدند. سپس در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور (۳۰۰۰ لوکس توسط لامپ‌های فلورسنت) به مدت ۴ هفته در دستگاه آکسوفیتون استوارد[3] نگهداری شدند. حرکت دورانی این صفحات به صورتی است که محیط کشت از این لوله‌ها بیرون نمی‌ریزد. این حرکت باعث می‌شود که اندام‌های مورد کشت به‌صورت متناوب از محلول غذایی خارج‌شده و بدین‌وسیله هوادهی انجام شود. بعد از گذراندن فاز القا، نمونه‌ها وارد فاز رئالیزاسیون یا مرحله ظهور جنین منتقل شدند و عمل واکشت[4] ریز نمونه‌ها در محیط‌های قبل اما باهدف ظهور جنین‌ها (فاز رئالیزاسیون) درحالی‌که هورمون از آن‌ها حذف‌شده، انجام پذیرفت. جهت حذف کامل هورمون، ریز نمونه‌ها در محیط‌های کشت ضدعفونی شده بدون هورمون و آگار، در سه مرحله به فواصل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شدند (Mashayekhi, 2007). پس از گذشت ۴ هفته در مرحله ظهور جنین‌ها، تعداد جنین‌های کروی (globular) و دوقطبی (bipolar) با استفاده از دستگاه استرئوسکوپ متصل به کامپیوتر در دو بزرگنمایی ۲۰ و ۴۰ میکرون مشاهده شدند (Mousavizadeh *et al.*, 2017).

1- Labtron, pH Meter-Thermometer, pHT 110, IRAN
2- Reyhan Teb, RT-2, IRAN
3- Auxophyton Steward
4- Subculture

اندازه‌گیری صفات

بعد از فاز رئالیزاسیون، میزان آنتوسیانین (Wanger, 1979)، کلروفیل و کاروتنوئید (Barnes *et al.*, 1992)، قند کل محلول و نشاسته (McCready *et al.*, 1950)، ساکارز (Handel, 1968)، گلوکز (Miller, 1959)، فروکتوز (Ashwell, 1957)، در جنین‌های رویشی اندازه‌گیری شدند.

طرح آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار ساکارز در سه تکرار انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SAS (SAS, 2001) و رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام گرفت. برای کمی سازی واکنش رنگیزه‌های فتوسنتزی جنین زایی رویشی مارچوبه به غلظت‌های مختلف ساکارز از مدل رگرسیونی استفاده شد. مدل رگرسیون ساده خطی[5] $(y = a + bx)$ برای آنتوسیانین و مدل رگرسیونی درجه دوم[6] $(y = a + bx + cx^2)$ برای کلروفیل و کاروتنوئید با کاربرد رویه Proc Reg در نرم‌افزار SAS (2001)، پردازش داده شده است. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

اثر ساکارز بر جنین‌زایی رویشی مارچوبه

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین غلظت‌های مختلف ساکارز از نظر تشکیل جنین در مراحل مختلف جنین‌زایی وجود دارد. طبق نتایج ارائه شده، تغییر در میزان غلظت ساکارز سبب تغییر در تشکیل تعداد جنین شده و بیشترین تعداد جنین کروی با اختلاف معنی‌داری $(p<0/001)$ در غلظت ۹ درصد ساکارز مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱).

طبق نتایج مقایسه میانگین، غلظت ۹ درصد ساکارز بیش‌ترین میزان جنین دوقطبی را در بین سایر غلظت‌های مختلف نشان داد (جدول ۱ و شکل ۱). بررسی غلظت‌های مختلف ساکارز بر جنین‌زایی رویشی گوجه‌فرنگی نیز نشان داد که ساکارز تأثیر معنی‌داری بر میزان جنین‌زایی رویشی در این گیاه دارد (Mashyekhi, 2007). در بررسی کاریر و هان در مورد تأثیر مواد موجود در محیط کشت بر روی کالوس‌زایی و القای جنین در گیاه آفتابگردان مشخص شد که غلظت ۱۲ درصد ساکارز در مقایسه با غلظت ۳ درصد آن برای القای جنین‌زایی رویشی مناسب‌تر است. کربوهیدرات نقش مهمی را در کشت‌های درون شیشه‌ای به‌عنوان منبع کربن و انرژی ایفا می‌کند.

جدول ۱- تجزیه آماری و مقایسه میانگین رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات قندی و تعداد جنین‌های رویشی مارچوبه در غلظت‌های مختلف ساکارز

Table 1- Statistical analysis and mean comparison of photosynthetic pigments, sugar compounds and number of asparagus somatic embryos in different consentration of sucrose

ساکارز Sucrose (%)	تعداد جنین کروی Number of globular embryo	تعداد جنین دوقطبی Number of bipolar embryo	کلروفیل a (mg.g^{-1}FW) Chlorophyll a	کلروفیل b (mg.g^{-1}FW) Chlorophyll b	کلروفیل کل (mg.g^{-1}FW) Chlorophyll Total	کاروتنوئید (mg.g^{-1}FW) carotenoids
3	2.33 b	3.33 ab	0.015 c	0.022 c	0.042 c	0.012 d
6	1.33 c	2.33 b	0.052 b	0.076 b	0.05 c	0.035 b
9	4.33 a	4 a	0.112 a	0.209 a	0.132 a	0.053 a
12	1.33 c	3.33 ab	0.014 c	0.02 c	0.073 b	0.02 c
15	0 d	0 c	0.043 b	0.078 b	0.046 c	0.021 c
Pr>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.001	<0.0001	<0.0001
ضریب تغییرات C.V (%)	27.66	24.59	16.37	11.17	14.04	14.77

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Numbers with common letters in each column do not differ significantly according to Duncan's multiple range test at the 5% of probability level.

ادامه جدول ۱- تجزیه آماری و مقایسه میانگین رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات قندی و تعداد جنین‌های رویشی مارچوبه در غلظت‌های مختلف ساکارز

Continued Table 1- Statistical analysis and mean comparison of photosynthetic pigments, sugar compounds and number of asparagus somatic embryos in different consentration of sucrose

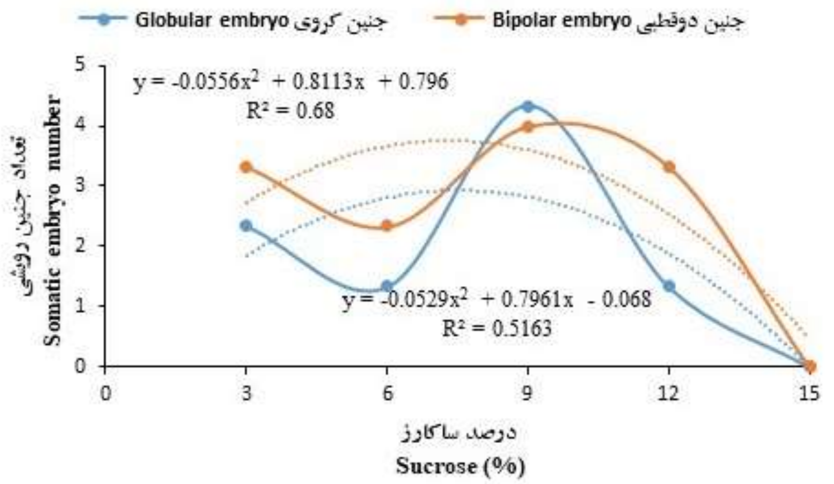
ساکارز Sucrose (%)	آنتوسیانین Anthocyanins (μmol.g^{-1}FW)	فروکتوز Fructose (mg.g^{-1}FW)	ساکارز Sucrose (mg.g^{-1}FW)	نشاسته Starch (mg.g^{-1}FW)	گلوکز Glucose (mg.g^{-1}FW)	قند کل Total sugar (mg.g^{-1}FW)
3	0.062 d	6.30 b	5.24 d	11.97 b	14.44 c	35.69 c
6	0.147 a	6.67 b	7.09 bc	12.70 b	13.27 c	30.80 d
9	0.082 c	5.91 b	6.10 cd	31.89 a	23.53 b	63.84 b
12	0.086 c	10.07 a	7.90 ab	14.33 b	30.44 a	70.54 a
15	0.131 b	5.79 b	8.82 a	17.72 b	23.57 b	17.41 e
Pr>F	<0.0001	<0.0004	<0.0048	<0.0001	<0.0004	<0.0001
ضریب تغییرات C.V (%)	6.48	11.86	12.79	17.04	15.46	4.65

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Numbers with common letters in each column do not differ significantly according to Duncan's multiple range test at the 5% of probability level.

ریزنمونه‌های کشت شده در ابتدا قادر به فتوسنتز نیستند. به‌این‌ترتیب افزودن کربوهیدرات به محیط کشت لازم و ضروری است. جنین‌زایی رویشی تحت‌تأثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب مواد و عناصر غذایی موجود در محیط‌های کشت مانند قند و ساکارز قرار می گیرد. نیاز به غلظت بالای کربوهیدرات نه‌تنها به عملکرد تغذیه‌ای ساکارز بلکه به خاصیت آن به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی نیز مربوط است. بااین‌حال، نقش غلظت زیاد قند در جنین‌زایی ممکن است بر پتانسیل اسمزی سلول تأثیر بگذارد و افزایش بیش از حد آن منجر به تنش اسمزی و از بین رفتن گیاه می شود. افزایش غلظت ساکارز در محیط ممکن است تنش اسمزی ایجاد کند، اما به رشد جنین‌های رویشی کمک می‌کند (Mashyekhi, 2007). رای و همکاران (Rai *et al*., 2007) نشان دادند که حتی استفاده نکردن از

ساکارز در محیط جنین‌زای گواوا باعث جلوگیری از تشکیل جنین رویشی می‌شود. به عقیده پژوهش‌گران مناسب‌ترین هیدروکربن برای محیط کشت جنین‌زا ساکارز می‌باشد و استفاده از ساکارز نسبت به گلوکز اثر تحریک‌کنندگی بیشتری روی توسعه جنین رویشی گل سرخ دارد (Burrell *et al*., 2006). کاستیلو و همکاران (Castillo *et al*., 2007) در فلفل، کیم و همکاران (Kim *et al*., 2004) در گل سرخ میزان ۳-۲ درصد ساکارز را برای جوانه‌زنی و تکامل جنین‌های رویشی پیشنهاد کردند. در مقابل گزارش شده است که گلوکز و فروکتوز باعث افزایش جنین رویشی در کاکائو Theobroma می‌شود (Elhag *et al*., 1987). در تحقیقی اعلام شده است که مورفوژنز و خصوصیات مورفولوژیکی خارجی جنین‌های رویشی توسط بیوشیمی پیچیده و مولکول‌های داخل بافت‌های سلولی تنظیم می‌شود بنابراین، درک مکانیسم فیزیولوژیکی آن بسیار مهم است (Manivannan *et al*., 2015). بر اساس نتایج مقایسه میانگین در غلظت ۱۵ درصد ساکارز هیچ جنینی مشاهده نگردید (جدول ۱ و شکل ۱). در مطابقت با این نتایج گزارش شده است که حداکثر فراوانی جنین‌های رویشی گیاه میخک در محیط حاوی ۹ و ۱۲ درصد ساکارز مشاهده شده است درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر ساکارز (۱۵ و ۱۸ درصد) کاهش یافت (Karami *et al*., 2006). همچنین نتایج این تحقیق با یافته‌های کادوتا و همکاران که بیان کردند غلظت بالای ساکارز همیشه منجر به ایجاد جنین رویشی نمی‌شود، مطابقت داشت همچنین گزارش شده که در غیاب ساکارز هیچ توسعه گیاهچه‌ای مشاهده نشده است (Kadota *et al*., 2001). با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، در مورد توسعه اندام زایی مارچوبه در محیط مایع B_5، ریشه‌زایی در غلظت ۶ درصد ساکارز همراه با رنگ‌دانه کلروفیل در شاخه ها مشاهده شد (شکل ۷ و ۸). این نتایج با نتایج گزارش شده در مورد اثرات کربوهیدرات‌های مختلف در طی جنین‌زایی رویشی در مارچوبه و سه نوع ترکیب ساکارز، فروکتوز و گلوکز مطابقت دارد (Mizukami *et al*., 2008). گلوکز باعث رشد ریشه، فروکتوز باعث رشد شاخه‌ها و ساکارز باعث رشد هر دو شاخه و ریشه می‌شود. غلظت کربوهیدرات نیز برای بلوغ و جوانه‌زنی مهم هستند. ترکیب ۶٪ ساکارز در محیط القای جنین و ۶٪ فروکتوز در محیط کشت بالاترین میزان جوانه‌زنی جنین ها را به همراه داشت (Mizukami *et al*., 2008). در تحقیقی از دامنه غلظت مختلف (۱۰-۵ درصد) و از منابع مختلف کربن (ساکارز، مانیتول و گلوکز) برای افزایش باززایی گیاه *Bacopa monnieri* استفاده گردید. مشاهده شد که محیط MS با ۵٪ ساکارز برای القا جوانه‌های شاخساره و باززایی اندام هوایی از ریز نمونه‌های تک گره‌ای بیشترین تأثیر را داشت (Srivastava *et al*., 2017). نتایج آزمایشی نشان داد که افزایش سطح غلظت ساکارز در محیط کشت می تواند تاثیر IAA بر الگوی جنین‌زایی و باززایی گیاه خیار را تغییر دهد. بدین صورت که در حضور IAA در غلظت (۱/۵۷ mM) و ساکارز (۱۳۱ mM) فقط شاخه های نابجا به وجود آمد در حالی که در غلظت بیشتر ساکارز تولید هر دو شاخه نابجا و جنین رویشی حاصل گردید. با افزایش بیشتر ساکاروز در محیط کشت (۳۹۴ میلی‌مول) نتیجه حاصله فقط تولید جنین رویشی و افزایش تعداد جنین‌های به وجود آمده تا ۷۰ درصد بود (Lou and Kako, 1995).



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر تعداد جنین‌های رویشی مارچوبه

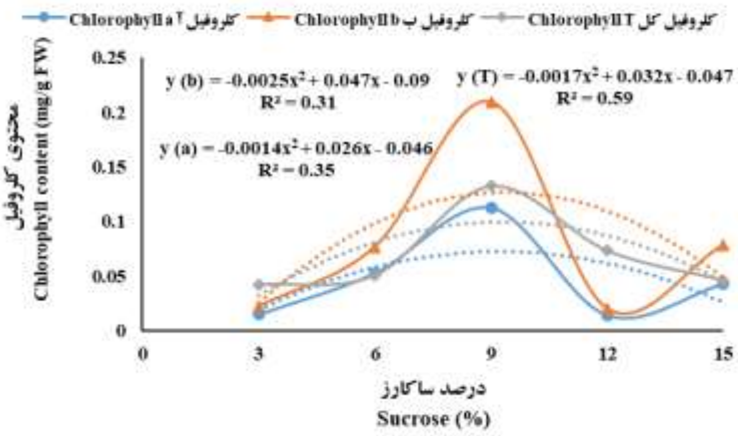
Figure 1- The effect of different levels of sucrose on the number of *Asparagus officinalis* somatic embryo

اثر ساکارز بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جنین های رویشی مارچوبه

نتایج آماری رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنتوسیانین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ساکارز وجود داشته است (جدول ۱). همان‌طور که شکل ۲ و ۳ نشان می‌دهد، بیش‌ترین میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید (به ترتیب mg/g.fw ۰/۱۱۲، ۰/۲۰۹، ۰/۱۳۲، ۰/۰۵۳) در غلظت ۹ درصد ساکارز و کم‌ترین مقدار کلروفیل a (۰/۱۱۴ mg/g.fw)، b (۰/۰۲ mg/g.fw) در غلظت ۱۲ درصد و کلروفیل کل و کارتنوئید به ترتیب (mg/g.fw ۰/۰۴۲، ۰/۰۱۲) در غلظت ۳ درصد مشاهده گردید. طبق شکل ۳، بیش‌ترین میزان آنتوسیانین (۰/۱۴۷ mg/g.fw) در ۶ درصد ساکارز و کم‌ترین آن (۰/۰۶۲mg/g.fw) در غلظت ۳ درصد ساکارز مشاهده شد. تجمع آنتوسیانین ناشی از قند در بسیاری از گونه‌های گیاهی مشاهده‌شده است. ساکارز مؤثرترین عامل بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهچه است. یکی از اثرات قندها در محیط کشت جنین‌زایی، اثر آنها بر روی سنتز کلروفیل در سلول‌های نمونه مورد کشت می‌باشد که باعث اتوتروف شدن آنها می‌گردد (Mashyekhi, 2007). جان و همکاران (Jain *et al.,* 1995) دریافتند که در زمان بلوغ جنین‌های رویشی، افزایش ساکارز در محیط باعث افزایش طول جنین‌ها شده و قبل از اینکه در معرض نور قرار گیرند، سبز می‌شوند که این از لحاظ اتوتروف شدن جنین‌ها بسیار مهم است. افزایش رشد ریشه‌ها و تولید ریشه‌های مویی نیز بوجود آمده و بازکشت مکرر مواد جنین‌زا در محیط دارای ساکارز زیاد موجب تشکیل جنین‌های نسل دوم که باریکتر و خمیده‌ترند می‌گردد. این جنین‌ها رنگدانه قرمز زیادی دارند و از جنین‌های نسل اول نیز بهتر رشد می‌کنند. وجود ارتباط بین وضعیت قند و تشکیل جنین رویشی به اثبات رسیده است به این صورت که افزایش قندهایی چون ساکارز منجر به افزایش پتانسیل جنین‌زایی می‌گردند. مناسب‌ترین هیدروکربن برای محیط کشت جنین‌زا ساکارز می‌باشد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر میزان ۹ درصد ساکارز در محیط کشت B5، نقش مهمی در ساخت کلروفیل نشان داد و باعث شدکه فتوسنتز و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در این محیط بالاتر رفته و در نتیجه میزان قند و تجمع آن در ریزنمونه‌های کشت‌شده در این محیط افزایش یافت و در نهایت باعث ظهور جنین‌هایی با رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های حاصل گردید.

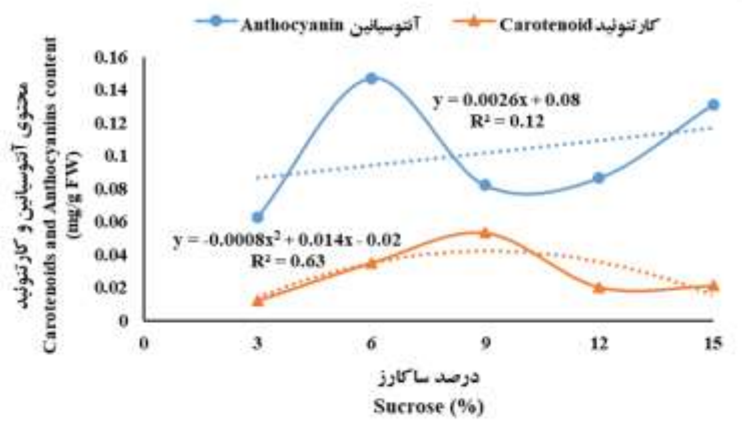
اثر ساکارز بر ترکیبات قندی جنین‌های رویشی مارچوبه

نتایج آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ساکارز از نظر ترکیبات قندی جنین های رویشی وجود داشته است (جدول ۱). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، بیش‌ترین میزان فروکتوز، گلوکز و قند کل (به ترتیب mg/g fw ۱۰/۰۷، ۳۰/۴۴، ۷۰/۵۴) در غلظت ۱۲ درصد ساکارز و کم‌ترین میزان فروکتوز و قند کل (mg/g fw ۵/۷۹، ۱۷/۴۱) در غلظت ۱۵ درصد ساکارز و همچنین کمترین میزان گلوکز (۱۳/۲۶ mg/g fw) در ۶ درصد ساکارز مشاهده شد (شکل ۴، ۵ و ۶). قندها در متابولیسم عمومی و تولید انرژی نقش اساسی دارند. علاوه بر این، در گیاهان قندها واحدهای اساسی برای تولید عناصر ساختاری هستند. قندها دارای عملکرد انتقال دهنده شبه هورمونی بوده و به‌عنوان پیام‌رسان اصلی در فرایندهای انتقال عمل می‌کنند که بسیاری از فرآیندهای مهم را در تمام مراحل چرخه حیات گیاه تنظیم می‌کند.



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر محتوی کلروفیل جنین‌های رویشی مارچوبه

Figure 2- The effect of different levels of sucrose on the chlorophyll content of *Asparagus officinalis* somatic embryo

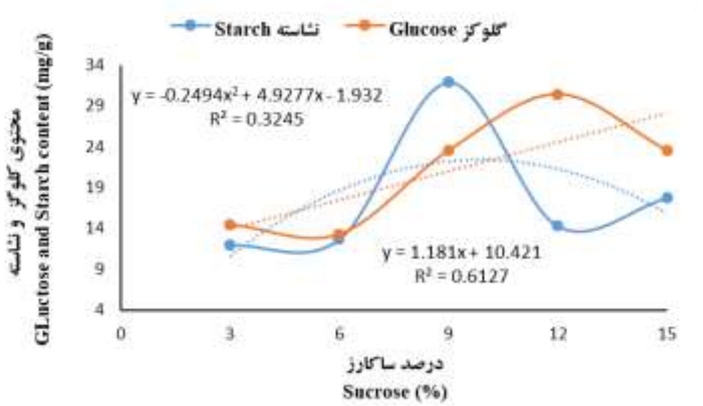


شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر محتوی کارتنوئید و آنتوسیانین جنین‌های رویشی مارچوبه

Figure 3- The effect of different levels of sucrose on the carotenoids and anthocyanins content of *Asparagus officinalis* somatic embryo

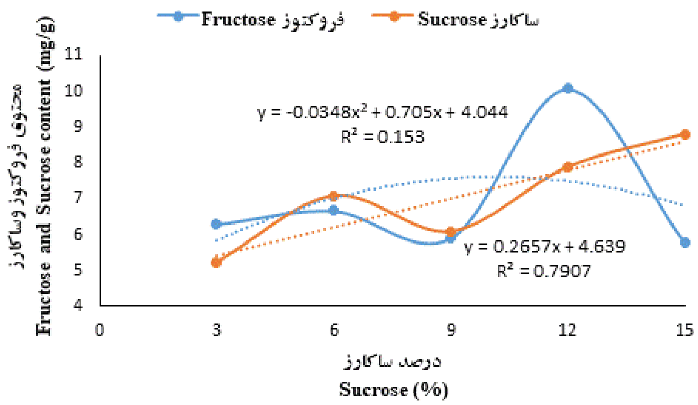
سیگنالینگ قند فرآیندهایی مانند فتوسنتز و متابولیسم مواد مغذی را جهت رشد و ذخیره‌سازی بافتها تنظیم می‌کند. سلول‌ها و بافت های گیاهی در محیط کشت فاقد توانایی اتوتروفیک هستند و بنابراین برای انرژی به کربن خارجی احتیاج دارند، افزودن منبع کربن خارجی به محیط به ازدیاد سلول‌ها و باززایی کمک می‌کند (Mousavizadeh *et al.*, 2010) غلظت بهینه ساکارز در یک محیط باید برای تأمین نیازهای اساسی ازجمله انرژی برای تقسیم سلولی و تمایز و همچنین کنترل القا و رشد کافی باشد و هیچ‌گونه اثر منفی اسمزی ایجاد نکند.

طبق نتایج تحقیق حاضر (جدول ۱)، بیش‌ترین میزان نشاسته (۳۱/۸۹mg/g fw) در غلظت ۹ درصد ساکارز (شکل ۴) و در مورد ساکارز بیشترین مقدار (۸/۸۲ mg/g fw) در ۱۵ درصد (شکل ۵) مشاهده گردید. کمترین میزان نشاسته و ساکارز (۱۱/۹۷ mg/g fw، ۵/۲۴) در غلظت ۳ درصد ساکارز (شکل ۴ و ۵) مشاهده شده است. کربن، نقش حیاتی در رشد، شکل‌گیری و حفظ پتانسیل اسمزی دارند که به‌نوبه خود بر میزان تقسیم سلول تأثیر می‌گذارد (Sotiropoulos *et al.*, 2006). نتایج حاصل از مطالعه جنین‌زایی رویشی گل مغربی نشان داد که فراوانی دانه‌های نشاسته در بذر گل مغربی نشان‌دهنده حضور سلول‌های جنینی برای ایجاد جنین‌های رویشی در این گیاه است؛ و هرچه میزان نشاسته در بذر این گیاه بیشتر باشد تمایل گیاه به ایجاد جنین‌های سوماتیک بیشتر می‌شود (Ghasemnezhad *et al.*, 2011). کربوهیدرات‌ها و یا احیاء آن‌ها می‌توانند جنین زایی رویشی را دستخوش تغییر زیادی نماید. به‌هرحال این توانایی جنین‌زایی رویشی توسط غلظت‌های زیاد کربوهیدرات‌هایی مثل نشاسته متأثر می‌گردد (Loiseau and Marche, 1995). سنتز نشاسته که ترکیبی از آمیلوز و آمیلوپکتین بوده و در آمیلوپلاست و کلروپلاست سلول‌های گیاهی انجام‌شده و تبدیل به محصولاتی مانند مالتوز و غیره می‌شود که انرژی زیادی را تولید می‌نماید و جنین‌زایی رویشی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، یکی از علائم کاملاً مشخص سلول‌های جنین‌زا وجود مقدار زیادی نشاسته در آن‌ها می‌باشد. به‌طور مثال در یک بررسی روی سوسپانسیون سلولی گیاه هویج، مقدار نشاسته خوشه‌های سلولی جنین‌زا، پانزده تا چهل بار بیشتر از سلول‌های غیر جنین‌زای مفرد و بزرگ با واکوئل‌های حجیم بود. ظاهراً تجمع نشاسته در سلول‌های جنین‌زا ابتدا و قبل از اینکه تمایزی در آن‌ها انجام می‌گیرد شروع می‌شود و در نتیجه سرنوشت سلول را مشخص می‌نماید (Mousavizadeh *et al.*, 2010). به طور کلی ساکارز در تنظیم فرآیندهای مهم متابولیکی از جمله جذب و انتقال کربن و نیتروژن و پاسخ به آسیب اکسیداتیو نقش اساسی دارد و نقش آن با قندهای دیگر مانند گلوگز جایگزین نمی‌شود.



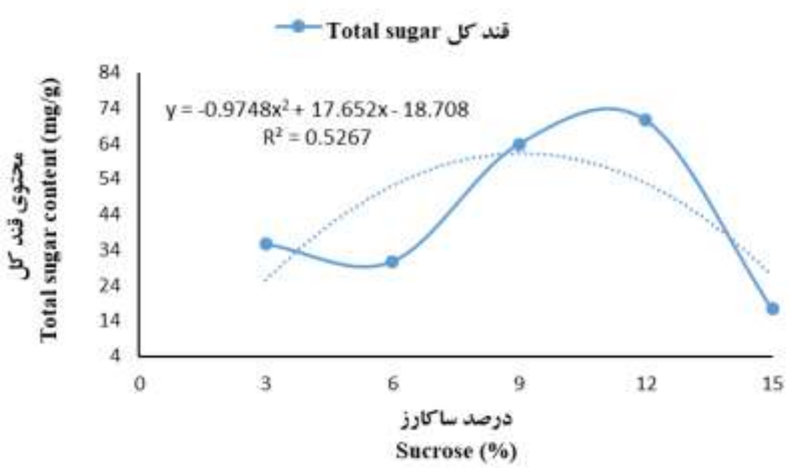
شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر محتوی نشاسته و گلوکز جنین‌های رویشی مارچوبه

Figure 4- The effect of different levels of sucrose on the starch and glucose content of *Asparagus officinalis* somatic embryo



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر محتوی فروکتوز و ساکارز جنین‌های رویشی مارچوبه

Figure 5- The effect of different levels of sucrose on the fructose and sucrose content of *Asparagus officinalis* somatic embryo



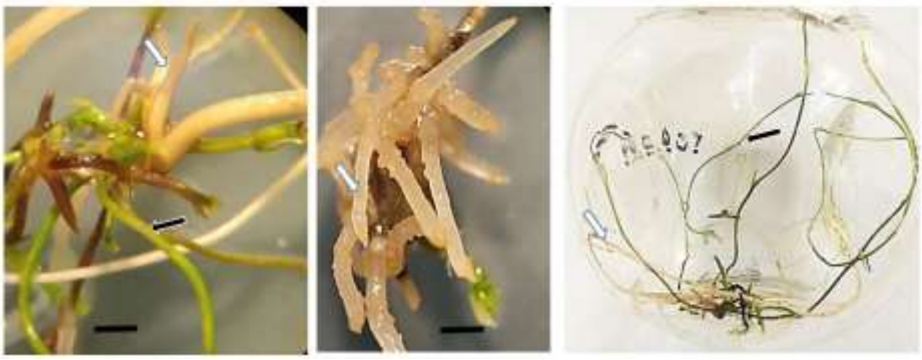
شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر میزان قند کل جنین‌های رویشی مارچوبه

Figure 6- The effect of different levels of sucrose on the total sugar content of *Asparagus officinalis* somatic embryo



شکل ۷- ریزنمونه‌های مارچوبه، سه هفته بعد از کشت در فاز رئالیزاسیون در محیط کشت مایع B5 حاوی دو پی‌پی‌ام 2,4-D همراه با غلظت‌های متفاوت ساکارز. (a) اندام‌زایی مستقیم و تولید کلروفیل در شاخه‌های تشکیل‌شده از محیط کشت مایع حاوی ۳ درصد ساکارز. (b) تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سفید) در محیط حاوی ۳ درصد ساکارز. افزایش آنتوسیانین در جنین‌های رویشی قابل‌مشاهده است. (c) تشکیل جنین کروی (پیکان سفید) در محیط حاوی ۶ درصد ساکارز. (d) اندام‌زایی مستقیم و تولید کلروفیل در شاخه‌های تشکیل‌شده از محیط کشت مایع حاوی ۶ درصد ساکارز. (e) تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سفید) و اندام‌زایی مستقیم (پیکان سیاه) در محیط حاوی ۹ درصد ساکارز. (f) تشکیل جنین دوقطبی (پیکان سفید) در محیط حاوی ۹ درصد ساکارز. افزایش آنتوسیانین در جنین‌های رویشی قابل مشاهده است. (g) اندام‌زایی مستقیم در محیط کشت مایع حاوی ۱۲ درصد ساکارز. (h) عدم توسعه جنین و اندام در محیط کشت مایع حاوی ۱۵ درصد ساکارز. (خط مقیاس: یک میلی‌متر)

Figure 7- *Asparagus officinalis* explants, three weeks after incubation in the realization phase in B5 liquid medium containing 2 ppm of 2, 4-D with different concentrations of sucrose. (a): Direct organogenesis and chlorophyll production in regenerated shoots from liquid medium with sucrose 3%. (b): Bipolar embryo formation (white arrow) in medium with sucrose 3%. (c): Globular embryo formation (white arrow) in medium with 6% sucrose. (d): Direct organogenesis and chlorophyll production in shoots formed from liquid culture medium containing 6% sucrose. (e): Bipolar embryo formation (white arrow) and direct organogenesis (black arrow) in medium with 9% sucrose. (f): Bipolar embryo formation (white arrow) in medium with 9% sucrose. The increase of anthocyanin can be observed in somatic embryo. (g) Direct organogenesis in liquid medium with 12% sucrose. (h) Non-formation of embryos and lack of organogenesis in liquid medium with 15% sucrose. (Bar= 1 mm)



شکل ۸- توسعه شاخه و ریشه مارچوبه در محیط مایع B5 حاوی دو پی‌پی‌ام 2,4-D همراه با ۶ درصد ساکارز

Figure 8- Development of *Asparagus officinalis* branch and root in B5 liquid medium containing two ppm 2,4-D with 6% sucrose

توسعه شاخه زایی به‌طور مستقیم (پیکان سیاه) از ریز نمونه همراه با رنگ‌دانه کلروفیل و ریشه‌زایی به‌طور مستقیم از ریز نمونه (پیکان سفید) در حضور ۶ درصد ساکارز. خط مقیاس: یک میلی‌متر

نتیجه‌گیری

کربوهیدرات‌ها ترکیبات اصلی گیاه هستند و در محیط کشت بافت بیشترین کاربرد را به‌خصوص ساکارز جهت رشد و تمایز دارد. قابل توجه است که غلظت زیاد ساکارز تنها جنبه تغذیه‌ای نداشته بلکه بیشتر باعث تغییر فشار اسمزی درون محیط کشت می‌گردد. وجود ارتباط بین وضعیت قند و تشکیل جنین رویشی به اثبات رسیده است در این بین ظرفیت ساکارز برای حمایت از رشد جنین بیشتر است به این صورت که افزایش قندهایی چون ساکارز منجر به افزایش پتانسیل جنین‌زایی می‌گردند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر میزان ۹ درصد ساکارز در محیط کشت B_5، نقش مهمی در ساخت کلروفیل نشان داد و باعث شد که فتوسنتز و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در این محیط بالاتر رفته و در نتیجه میزان قند و تجمع آن در ریزنمونه‌های کشت شده در این محیط افزایش یافت و در نهایت باعث ظهور جنین‌هایی با رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های حاصل گردید. افزایش سطح ساکارز همچنین از جوانه‌زنی سریع جلوگیری می‌کند و به توسعه سیستم ریشه و شاخساره کمک می‌کند.

منابع

1. Ashwell, G. (1957). *In Method in Enzymology*, vol. 3, p. 85. Ed. by Colowick, S. P. & Kaplant, N. 0. New York: Academic press Inc.
2. Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, A.W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Environment. Experimental. *Botany* 32: 85-100. https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90034-Y.
3. Bartos, P.M.C., Gomes, H.T., Velho Do Amaral, LI., Teixeira, J.B., & Scherwinski-Pereira, J.E. (2018). Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Biotechnology* 8: 330-391. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1238-7.
4. Bhattacharjee, P., & Singhal, R.S. (2011). Asparagus, broccoli and cauliflower, production, quality and production, quality, processing. *Blackwell Publishing Coexpression and Transcriptome 25*(8): 24-119. https://doi.org/10.1002/9780470958346.ch25.
5. Burrell, A.M., Lineberger, R.D., Rathore, K.S., & Byrne, D.H. (2006). Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. *HortScience 41*(5): 1165-1168. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.5.1165.
6. Castillo, P.Y.Z., Flick, A.C., Puc, G.L., Ruiz, A.S., Pere, F.B., Buzzy, N.S., & Andra, L.I. (2007). Somatic embryogenesis in Habanero Peper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspension. *HortScience 42*(2): 329-333. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.2.329.
7. Castillo, F., & Hahne, G. (1998). Induction of embryogenesis versus callogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Science 137*(1): 63-71. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00128-9.
8. Castillo, A., Mookkan, M., Huo, H., Chae, K., & Ozias-Akins, P. (2015). A parthenogenesis gene of apomict origin elicits Embryo from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 28*(4): 283-287. https://doi.org/10.1073/pnas.1505856112.
9. Dogan, M. (2020). The Effects of Different Sucrose Concentrations on the Regeneration Area of Riccia Fluitans L., A Medicinal Aquatic Plant. *Journal of Engineering Technology and Applied Sciences 5*(2): 51-58. https://doi.org/10.30931/jetas.763863.
10. Eapen, S., & George, L. (1990). Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22*(2): 87-93. https://doi.org/10.1007/BF00043683.
11. Elhag, H.M., Whipkey, A., & Janick, J. (1987). Induction of somatic embryogenesis from callus in *Theobroma cacao* in response to carbon source and concentration. *Rev Theobroma* 17: 153–162.
12. Gamburg, O.L., Miller, R.A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Response* 50: 151-158.
13. Ghasemnezhad, A., Mousavizadeh, S.J., & Mashayekhi, K. (2011). A study on evening-primrose (*Oenothera biennis* L.) callus regeneration and somatic embryogenesis. *Iranian Journal of Biotechnology 9*(1): 31-36.
14. Guerra M.P., Silveira V., Dos-Santos A.L.W., Astarita L.V., & Nodari R.O. (2000). *Somatic embryogenesis in Araucaria angustifolia* (BERT) O .KTZE. In Jan, M.S., Gupta, P.K., & Newton, R.J. (ed.), Somatic Embryogenesis in woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands 6: 457-478.
15. Handel, E.V. (1968). Direct micro detemination of sucrose. *Journal of Analytic Biochemistry* 22: 280-283.

16. Jain, M.S., Gupta, P.K., & Newton, R.J. (1995). *Somatic embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers 1: 253-263.
17. Kadota, M., Imizu, K., & Hirano, T. (2001). Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Scientia Horticulturae* 89: 207–215. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00234-X.
18. Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T., & Harada, H. (1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 25: 1163-1166. https://doi.org/10.1007/BF02621268.
19. Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., & Ostad-Ahmadi, P. (2006). Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae 110*(4): 340-344. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.029.
20. Kim, C.K., Oh, J.Y., Chung, J.D., Burrel, A.M., & Byrne, D.H. (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration from *in vitro*-grown leaf explant of rose. *HortScience 39*(6): 1378-1380. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.6.1378.
21. Loiseau, J., & Marche, C. (1995). Effect of auxins, cytokinins, carohydrate and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. *Plant Cell Tissue and Organ Culture 41*(3): 267-275. https://doi.org/10.1007/BF00045091.
22. Lou, H., & Kako, S. (1995). Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Scientia Horticulturae 64*(1-2): 11-20. https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00833-8.
23. Maciej, Z., Weronika, D., Mikolay, K., & Elzbieta, Z. (2012). Screening of *Asparagus officinalis* L. seed or occur and Ploidy of twin embryos. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 54*(2): 121-128. https://doi.org/10.2478/v10182-012-0029-4.
24. Manivannan, A., Jana, S., Soundararajan, P., & Jeong, B.R. (2015). Antioxidant enzymes metabolism and cellular differentiation during the developmental stages of somatic embryogenesis in *Torilis japonica* (Houtt.) DC. *Plant Omics* 8: 461-471.
25. Mashyekhi, K. (2007). *Plant Somatic Embryogenesis*. Makhtomgholi Fraghi (Sarli) press. 488 P. (In Persian)
26. McCready, R.M., Guggolz, J., Silvera, V., & Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylase in vegatable. *Journal of Analytical Chemistry* 22: 1156-1158.
27. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Journal of Analytical Chemistry* 31: 426-428.
28. Mizukami, K., Takeda, T., Satonaka, H., & Matsuoka, H. (2008). Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls. *Biochemical Engineering Journal 38*(1): 55-60. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.06.004.
29. Mousavizadeh, S.J., Hassandokht, M.R. Kashi, A., Gil, J., Cabrera, A., & Moreno, R. (2016). Physical mapping of 5S and45S rDNA genes and ploidy levels of Iranian Asparagus species. *Scientia Horticulturae* 211: 269-276. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.011.
30. Mousavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., Hemmati, K.h., & Kamkar, B. (2010). Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of Carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Plant Production 17*(1): 1-21. (In Persian)
31. Mousavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., & Hassandokht, M.R. (2017). Indirect somatic embryogenesis on rare octoploid *Asparagus breslerianus* plants. *Scientia Horticulturae* 226: 184-190. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.031.
32. Mukhopadhyay, S., & Desjardins, Y. (1994). A comparative study on mode of culture and plant rgeneration from protoplast-derived somatic embryos of two genotypes of *Asparagus officinalis* L. *Plant Science* 10: 97–104. https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90137-6.
33. Rai, M.K., Akhtar, N., & Jaiswal, V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulture 11*(2): 129-133. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.02.010.
34. Regalado, J., Carmonan, E., Castrn, P., Moreno, R., Gil, Martı, J., & Encina, C. (2015). Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis. Plant Cell Tissue and Organ Culture* 122: 31–44. https://doi.org/10.1007/s11240-015-0747-x.
35. Roowi, SH., Ho, C., Alwee, SSRS., Abdullah, MO., & Napis, S. (2010). Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. *Molecular Biotechnology* 46: 1-19. https://doi.org/10.1007/s12033-010-9262-9.
36. SAS. (2001). *SAS/STAT user´s guide*. Version 9. SAS Institute, Cary, N.C. USA.

37. Sathish, S., Safia, N., Sivakumar, S., Venkatesh, R., & Sathishkumar, R. (2019). Optimizing culture conditions for high frequency somatic embryogensis and plantlet conversion in (*Daucus carota* L.). *Institute of Molecular Biology 17*(1): 3-11. https://doi.org/10.2478/s11756-019-00223-0.
38. Sotiropoulos, T.E., Molassiotis, A.N., Mouhtaridou, G.I., Papadakis, I., Dimassi, K.N., Therios, I.N., & Diamantidis, G. (2006). Sucrose and sorbitol effects on shoot growth and proliferation *in vitro*, nutritional status and peroxidase and catalase isoenzymes of M 9 and MM 106 apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *European Journal of Horticultural Science* 71: 114–119.
39. Srivastava, P., Tiwari, K.N., & Srivastava, G. (2017). Effect of different carbon sources on *in vitro* regeneration of Brahmi *Bacopa monnieri* (L.) An important memory vitalizer. *Journal of Medicinal Plants Studies 5*(3): 202-208.
40. Wanger, G.J. (1979). Content and vacuole distribution of neutral sugars, free amino acid, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology* 64: 88-93.
41. Widal, H., Nelson, W., Booij, H., & Devies, S. (2010). Gene expression program in embryogenic and nonembryogenic carrot culture. *Plant* 176: 205-211. https://doi.org/10.1007/BF00392446.